

Analyse des PCB dans les biotes marins

Références de la méthode

La méthode qui suit est dérivée de la publication suivante	Munsch et al., 2005. Analyses de contaminants organiques (PCB, OCP, HAP) dans les organismes marins. Ed. Ifremer, méthodes d'analyses en milieu marin, 44p. ISSN 1637-1844 / ISBN 2-84433-144-0
Norme française et/ou européenne dont est tirée la méthode	Néant
Niveau de validation selon Norman	Niveau 1 (intra-laboratoire) Validation selon Norme NF T90-210 Mai 2009
Code SANDRE de la méthode	<i>Les méthodes ne sont codifiées qu'à partir du niveau de validation 2</i>

Généralités

Nom de la famille de substances	Polychlorobiphényles (PCB) ou biphényles polychlorés. La méthode décrite ci-dessous est potentiellement applicable, après validation spécifique, à d'autres congénères que ceux mentionnés. La liste des congénères choisis (ci-dessous) comprend les substances prioritaires pour la Convention OSPAR (PCB indicateurs). Elle correspond à ceux retrouvés majoritairement dans les biotes marins, et à ceux pour lesquels on dispose sur le marché d'étalons purs, et de valeurs de référence (matériaux certifiés). La matrice sur laquelle a porté la validation selon NF T90-210 (Mai 2009) est « les mollusques marins » (moule). La méthode peut-être applicable à d'autres types de biote marin après validation spécifique sur des matrices adaptées, par exemple à teneurs lipidiques différentes (muscle et foie de poisson).
Nom des substances individuelles	CB-28 : 2,4,4'-Trichlorobiphenyl CB-52 : 2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl CB-101 : 2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl CB-105 : 2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl CB-118 : 2,3',4,4',5- Pentachlorobiphenyl CB-138 : 2,2',3,4,4',4',5-Hexachlorobiphenyl CB-153 : 2,2',4,4',5,5',-Hexachlorobiphenyl CB-156 : 2,3,3',4,4',5-Hexachlorobiphenyl CB-180 : 2,2',3,4,4',5,5'- Heptachlorobiphenyl
Code(s) SANDRE des substances individuelles	CB-28 : 1239 CB-52 : 1241 CB-101 : 1242 CB-105 : 1627

	CB-118 : 1243 CB-138 : 1244 CB-153 : 1245 CB-156 : 2032 CB-180 : 1246
Matrice analysée	Biote : Mollusques
Acronyme	ASE – CPG/ECD
Principe de la méthode	Extraction des PCB par extraction par solvant pressurisé à chaud (ASE) au dichlorométhane, purification et séparation par chromatographie de perméation de gel (GPC) et chromatographie d'adsorption, analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) en mode de détection ECD
Domaine d'application	100 pg/g à 450 ng/g poids sec
Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	Pourcentage d'humidité (déterminé par gravimétrie) Pourcentage de lipides (déterminé par gravimétrie, matières organiques extractibles par un mélange hexane/acétone 80:20 v/v)
Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode	Manipulation sous hotte, utilisation de verrerie calcinée pour échantillon et extraits, utilisation de solvants de qualité Atrasol ou équivalent

AVERTISSEMENT : Il convient que l'utilisateur de cette méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Cette méthode n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur. Certains des solvants utilisés dans le mode opératoire sont toxiques et dangereux. Les manipuler avec précaution.

Il est absolument essentiel que les essais conduits conformément à cette méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation adéquate.

Protocole analytique

Prétraitement

Fraction analysée :	Biote : Mollusques (corps entier)
Conditionnement et conservation des échantillons	Conservation sous forme congelée à -20°C en attente de lyophilisation, conservation sous forme lyophilisée à l'abri de la lumière et température ambiante, dans flacons en verre ambré.
- Protocole :	Mollusques : épurer (24 heures), décoquiller, égoutter, broyer/homogénéiser, lyophiliser, broyer/homogénéiser à nouveau avant prise d'essai
- Nature du contenant de stockage :	Verrerie
- Lavage du contenant :	Eau + acides organiques neutralisants (lavage machine), puis passage au four à 450°C pendant 8 heures
- Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température,...) :	
Filtration :	Sans objet

Pré-traitement des échantillons liquide ou solide

Décoquillage/Dissection, Broyage, Lyophilisation
Précautions : contamination croisée possible entre échantillons de niveaux de contamination différents. Il est recommandé de faire un blanc de lyophilisation régulièrement.
Les échantillons frais peuvent également être analysés après mise en contact 24h avec du sulfate de sodium anhydre (4g de sulfate pour 1g d'échantillon humide)

Analyse

Volume ou masse de la prise d'essai (mL ou mg selon la phase analysée)

5g en général, pouvant varier de 0,5g à 12g poids sec (le poids sec doit être déterminé juste avant analyse sur une quantité aliquote pour calculer la reprise d'humidité pouvant se produire entre la lyophilisation et l'analyse). Pour les échantillons frais, analyser 20g en général.

Dérivation

Sans objet

Extraction

- ASE (T°C, P, solvant d'extraction, nombre de cycles, % de flush)

Sur cellules (volumes 11ml à 33ml) remplies d'échantillon lyophilisé (ou frais + sulfate de sodium) + poudre de verre (les cellules auront été préalablement nettoyées à l'ASE avec un mélange DCM : méthanol 50:50, la poudre de verre passée à 450°C pendant une nuit) :

Deux cycles d'extraction successifs selon les conditions suivantes :

Solvant : Dichlorométhane (DCM)

Pression : 138 bars

Température : 100°C

Temps de chauffage : 5 minutes

Temps d'extraction : 5 x 2 minutes pour chaque extraction (deux extractions au total)

Volume de rinçage : 35% pour chaque extraction

Temps de purge : 150 secondes

Après extraction : concentration des extraits à l'évaporateur rotatif ou système équivalent, puis à l'évaporateur sous jet d'azote, dans le DCM, jusqu'à 3ml environ

Purification

(type de purification, paramètres de purification, méthode d'évaporation)

1. CES : chromatographie d'exclusion stérique sur colonne en verre (460mm x 26mm) remplie de copolymère de styrène divinylbenzène (Bio-Beads SX-3, 200-400 Mesh), au moyen d'un système automatisé. L'élution est réalisée au dichlorométhane à 5ml/min. Récupérer l'extrait après les 40 premières minutes d'élution sur la colonne au moyen d'un collecteur de fraction (temps d'élution à déterminer précisément selon configuration du système. A titre indicatif, le temps de collecte est voisin de 40 minutes, soit 200ml).

Après CES : concentrer et reprendre l'extrait dans l'iso-octane jusqu'environ 0.5mL. Ne jamais aller à sec.

2. Chromatographie d'adsorption sur colonne en verre (300mm x 10mm) remplie successivement de : laine de verre, silice (7g, 100-200 Mesh) désactivée (5% eau en masse), alumine (7g, 70-230 Mesh) désactivée (5% eau en masse). Conditionner la colonne avec environ 25mL d'hexane. Ne jamais laisser la colonne à sec. Déposer l'extrait en tête de colonne.

	<p>Elution à environ 1 goutte/seconde: F0 : 10ml 100% hexane F1 : 32ml 100% hexane Récupérer F1 seulement Concentrer l'extrait jusqu'à environ 1ml</p>
Minéralisation	Sans objet
Volume ou masse finale avant analyse :	Concentrer à l'évaporateur sous jet d'azote à un volume de 20µl à 1000µl selon les niveaux de contamination des échantillons, en reprenant progressivement dans l'iso-octane (ne jamais aller à sec)
Méthode analytique utilisée Indiquer les paramètres complets de la méthode (exemple pour la chromatographie : gradient, phase mobile, débit, T °C, colonne, mode de détection) Pour la détection par masse : mode d'ionisation et ions de quantification et de confirmation	<p>CPG DB-5 (5% Diphényl et 95% méthyl-polysiloxane), 60m, 0.25mm d.i., 0.25µm épaisseur de phase HT-8 (8%-phényl-polysiloxane-carborane), 50m, 0.22mm d.i., 0.25µm épaisseur de phase</p> <p>Programmation four : 100°C (1min.), 180°C (77min.) , 280°C (3°C/min.), 25min. Les deux colonnes peuvent être utilisées simultanément (système à deux injecteurs, deux détecteurs) Gaz vecteur : Hydrogène, 1ml/min</p> <p>Injecteur : splitless Split liner 3.4mm x 5.0mm x 54mm, Siltek désactivé 280°C Volume injecté : 1µl</p> <p>Détecteur ECD 300°C Débit gaz make-up (N₂) : 25-30ml/min</p>
Equipement (modèles utilisés) :	VARIAN 3800
Type d'étalonnage	Externe
Modèle utilisé	Linéaire
Etalons / Traceurs utilisés	Etalons externes de rendement : CB-30, TCN, CB-198, CB-209 (ajoutés avant l'extraction à partir d'une solution préparée par exemple dans l'iso-octane)
Domaine de concentration	Gamme d'étalonnage : 25-150pg/µl (domaine de linéarité)
Méthode de calcul des résultats	Correction par le rendement : Non. Toutefois, l'obtention de rendements inférieurs à 50% pour l'un au moins des 4 étalons utilisés conduit au rejet des résultats pour l'échantillon concerné.

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée	NF T90-210 (mai 2009).
Modèle utilisé	Linéaire
Domaine de validation	25-150pg/µl injecté
Matériaux de référence certifiés utilisés	BCR 682 (tissu de moule), contenant les congénères certifiés suivants: CB-28, CB-52, CB-118, CB-138, CB-149, CB-153, CB-170, CB-180

Blancs analytiques

(concentration ou résultat maximum acceptable)

Blancs réalisés sur silice sur l'ensemble du protocole à partir de l'extraction < LQ pour tous les congénères

Rendement**- par type de matrice**

Matériau certifié BCR 682 (tissu frais de moule)

- par niveau de concentration

0.30 à 9.2µg/kg poids humide selon les congénères

- par molécule

(si moyenne préciser le nombre de répétitions et l'écart-type)

Pour les molécules certifiées dans le matériau utilisé, 5 séries de 2 répétitions en condition de fidélité intermédiaire

Congénère	Rendement %	CV fidélité intermédiaire %
CB-28	81	9
CB-52	87	11
CB-118	78	11
CB-138	94	8
CB-153	99	9
CB-180	80	8

Limite de détection (LD)**Limite de quantification (LQ)**

(indiquez la méthode de détermination en précisant la matrice testée)

LQ = 100pg/g poids sec

LQ correspondant à la limite inférieure du domaine de linéarité (25pg/µl), 20µl extrait concentré, 5 grammes matière extraite. Vérification de la LQ sur cinq séries d'analyse en condition de fidélité intermédiaire sur silice dopée à une valeur proche de la LQ

Spécificité de la méthode (préciser la matrice)

Testée : Non

Interférents possibles : co-élutions entre différents congénères de CB, partiellement résolues grâce à l'analyse sur deux colonnes chromatographiques de polarités différentes

Incertitudes (%) sur les résultats**- par type de matrice**

Matériau certifié BCR 682 (tissu frais de moule)

- par niveau de concentration

0.30 à 9.2µg/kg poids humide selon les congénères

- par molécule

(reproductibilité avec méthode de détermination)

Incertitude élargie U(y) avec $U(y) = 2 \times u(y)$, où u(y) = incertitude combinée (justesse, linéarité)

Congénère	U(y) relatif %
CB-28	43
CB-52	37
CB-118	43
CB-138	29
CB-153	26
CB-180	34

Contacts

Auteurs

Catherine Munsch / Céline Tixier

Institut

IFREMER

Adresses mailcmunsch@ifremer.fr / ctixier@ifremer.fr